

Immunoelektrophoretische Untersuchungen
zur Frage der Reinheit
vertikalelektrophoretisch gewonnener
Serumeiweißfraktionen

von

SIGRID BRÄUER

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

Immunoelektrophoretische Untersuchungen zur Frage
der Reinheit vertikalelektrophoretisch gewonnener
Serumeiweissfraktionen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München



vorgelegt von

Sigrid Bräuer

aus

Birkenfeld

1959

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Seitz

Dekan: Prof. Dr. K. Kolle

Tag der mündlichen Prüfung: 17. März 1959

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Einleitung	Seite	4
Methodik		5
A Die vertikalelektrophoretische Auftrennung des Serums		5
B Die papierelektrophoretische Kontrolle der ver- tikal aufgetrennten Serumproteinfraktionen		7
C Die immunoelktrophoretische Untersuchung der vertikal aufgetrennten Serumproteinfraktionen		9
Diskussion der Methodik		10
1. bei der Vertikalelektrophorese		10
2. bei der Immunoelktrophorese		11
Ergebnisse		12
Diskussion der Ergebnisse		14
Zusammenfassung		16
Abbildungen		17
Literatur		19
Lebenslauf		21

E I N L E I T U N G

Neben dem freien Blutzucker, der nach Ausfällen des Eiweisses im Filtrat bestimmt wird, ist im Serum eine gleich-grosse Menge eiweissgebundener Kohlenhydrate (KH) vorhanden. Dieser sogenannte gebundene Zucker ist in fast allen Eiweiss-körpern enthalten. Eiweisskörper, in denen die KH-Komponente über 8 % beträgt, werden als Glykoproteide bezeichnet.

Ebenso wie sich bei vielen Erkrankungen die Relation der einzelnen Serumproteinfraktionen verschiebt, verändert sich auch die Menge des eiweissgebundenen Zuckers in den einzelnen Fraktionen. Das wurde durch K ö i w und G r ö n w a l l (1952) und S t u m p f (1956) nach horizontalelektrophoretischer Auftrennung des Serums nachgewiesen. Hier wurde Serum nach der bekannten Methode von G r a s s m a n n und H a n n i g aufgetrennt. Dann wurden auf zwei Elektrophoresestreifen einmal die Proteine mit Amidoschwarz und zum anderen die eiweissgebundenen KH nach der von H o t c h k i s s 1948 entwickelten Methode elektiv angefärbt. Durch Vergleich der beiden so gewonnenen Elektrophoresekurven konnte eine quantitative Beziehung zwischen den Serumeiweissfraktionen und den zugehörigen KH hergestellt werden. Mit Hilfe dieser Methode lässt sich der KH-Gehalt in Relativprozenten angeben.

Eine Möglichkeit, Aussagen über die absolute Menge der KH in den einzelnen Eiweissfraktionen zu machen, bietet die vertikalelektrophoretische Auftrennung des Serums nach G r a s s m a n n und H a n n i g (1953). Hier können die einzelnen Fraktionen präparativ in vitro gewonnen und kolorimetrisch in Gewichtseinheiten bestimmt werden. Da die KH im elektrischen Feld mit ihren Trägerproteinen wandern, können sie auf gleiche Weise gewonnen werden. Aus der vertikalelektrophoretisch hergestellten Lösung — Puffer - Eiweissfraktion — wird diese mit absolutem Alkohol ausgefällt und in einer bestimmten Menge Aqua dest. wieder in Lösung gebracht. Quantitativ wird einerseits mit Orcin der darin enthaltene Zucker (Hexosen), zum anderen mit Biuret die Menge reinen Eiweisses

kolorimetrisch bestimmt. Durch Vergleich beider Werte kann auch der Prozentgehalt der einzelnen Fraktionen an KH gefunden werden.

Unsere Untersuchungen über die Zucker-Eiweiss-Relation in den mittels Vertikalelektrophorese aufgetrennten Serumproteinfractionen scheiterten 1 1/2 Jahre immer wieder daran, dass sich einzelne Fraktionen nicht rein darstellen liessen. Wir kontrollierten die Reinheit dadurch, dass wir die aufgetrennten Fraktionen nochmals mit dem zugehörigen Serum als Vergleich im elektrischen Feld wandern liessen, und stellten dabei neben reinen Fraktionen Mischungen zwischen zwei oder drei Fraktionen fest. Die Auswertungsergebnisse der Eiweiss- und Zuckerbestimmungen zeigten uns aber, dass die Kontrolle mittels der Horizontalelektrophorese nicht die erforderliche Genauigkeit hatte.

In der 1953 von G r a b a r und W i l l i a m s entwickelten Immunoelktrophorese nach einer Modifikation nach S c h e i d e g g e r (1955) fanden wir dann eine Möglichkeit, die Reinheit der einzelnen Fraktionen bzw. Fraktionsgemische genau zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit soll diese Kontrollmethode im Einzelnen geschildert und zu ihren Ergebnissen Stellung genommen werden.

M e t h o d i k

A Die vertikalelektrophoretische Auftrennung des Serums

Zur Durchführung der vertikalen Elektrophorese wurde mit geringen Modifikationen die von G r a s s m a n n und H a n n i g angegebene Methode verwendet.

Grundgedanke: Die Vertikalelektrophorese beruht wie die Horizontalelektrophorese auf dem Prinzip der verschieden starken anodischen Wanderung der einzelnen Serumproteinfractionen. Dies wird hierbei bewirkt durch den horizontalen Stromfluss durch den Trennbogen, der gleichzeitig vertikal von Puffer durchströmt wird. Aus diesen beiden Vektoren —

horizontale Ablenkung und Transport der Ionen mit dem Puffer in vertikaler Richtung — ergeben sich die Winkel des Serumproteinspektrums.

Geräte:

Elphor Va Gerät nach Grassmann und Hannig

Dosierpumpe

Der verwendete Puffer war verdünnter Veronal-Natriumacetat-Puffer nach M i c h a e l i s (1931) mit einer Wasserstoffionenkonzentration von $\text{pH} = 8,6$ und der Ionenstärke $\mu = 0,04$. Die Zusammensetzung war:

Veronal-Natrium DAB 6	49,0466
Natr. acet. crist.	32,380
Acid. hydrochloricum 0,1 n	300,0 ml
Aqua dest.	ad 5000,0

Diese Menge wurde mit Aqua dest. auf 12,5 l verdünnt.

Dem Puffer wurde zur Hemmung des Pilzwachstums eine Messerspitze Thimerosal zugesetzt.

Am geeignetsten waren Elphor Va Trennbögen Nr. 2040 bm von Schleicher & Schüll.

Verfahren: In dem Elphor Va Rahmen werden die elektrodenführenden Rinnen mit angefeuchteten Zellophanfolienstreifen abgedeckt. Dann wird der Trennbogen, der am oberen Ende in eine Pufferwanne taucht, eingespannt und gleichmässig mit dem 2 1/2-fach verdünnten Michaelispuffer angefeuchtet. Die Zacken am unteren Rand des Bogens werden so in eine Doppelreihe von Glastrichtern am Boden des Rahmens geführt, dass sie fest an deren Wand anliegen. Dann wird der Rahmen in die Elphor Va Kammer eingestellt und eine Stromstärke von 26 mA bei einer Spannung von ca. 400 V angelegt. Die Öffnungen der vorderen Glaswand werden mit Gummistopfen verschlossen, um eine stärkere Abdunstung zu verhindern. Oberhalb des Gerätes sind drei mit Puffer gefüllte Boyle-Mariotte'sche Flaschen angebracht, aus denen die Flüssigkeitsmenge in der Pufferwanne auf ein Drittel der Wannenhöhe konstant gehalten und

die elektrodenführenden Rinnen gleichmässig mit einer Tropfenzahl von 28 - 30 / min. durchströmt werden.

Nach 1 bis 1 1/2 Stunden — es ist zu erwarten, dass das feuchte Papier in dieser Zeit gleichmässig aufgeladen ist — wird die Dosierpumpe mit dem aufzutrennenden Serum angeschlossen. Die Pumpe wird so eingestellt, dass aus einer 10 ml - Spritze 0,18 ml Serum in der Stunde auf die der Kathode nähere Auftragstelle des Trennbogens fliessen.

Der Menge von 10 ml Serum wurde 1 Tropfen Bromphenolblau zugesetzt, das elektiv Albumin anfärbt, sodass der Grad der Ablenkung von der Vertikalen sichtbar wird.

Wenn nach 6 - 7 Stunden das Spektrum am unteren Rand des Bogens angelangt ist, wird unter die Trichter der Apparatur eine Doppelreihe von Glasröhrchen gestellt, in denen die mit Puffer vermischten Fraktionen aufgefangen werden. Nach weiteren 24 Stunden, in denen Stromstärke, Spannung und die Füllung der Pufferflaschen regelmässig kontrolliert werden, werden die Röhrchen aus der Apparatur genommen und horizontalelektrophoretisch auf ihren Inhalt geprüft.

B Die papierelektrophoretische Kontrolle der vertikal aufgetrennten Serumproteinfraktionen

Es wurde im Wesentlichen nach der von Grassmann und Hannig angegebenen Methode gearbeitet.

Grundgedanke: Die eiweisshaltigen Flüssigkeiten werden auf einen mit Pufferlösung getränkten Filterpapierstreifen aufgetragen, dieser in eine feuchte Kammer gebracht, wobei die beiden Streifenenden in zwei getrennte Abschnitte mit Pufferlösung eintauchen, und eine konstante Gleichspannung angelegt. Aus der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Serumeiweisskörper im elektrischen Feld resultiert nach einer bestimmten Zeit eine Auftrennung in die einzelnen Fraktionen. Die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt vom Albumin zum gamma-Globulin ab.

Geräte: Zur Durchführung der Elektrophorese wurden Elektro-

phoresekammern nach Grassmann und Hannig benutzt (Hersteller: Bender & Hobein).

Reagentien: Der verwendete Puffer war Veronal-Natriumacetat-Puffer nach Michaelis (pH 8,6, Ionenstärke $\mu = 0,1$). Am geeignetsten waren Filterpapierstreifen 2043 Mgl. von Schleicher & Schüll.

Verfahren: Auf dem Filterpapierstreifen wird 10 cm von einem Ende senkrecht zur Streifenlänge die Auftragstelle markiert, diese Linie in vier Rubriken eingeteilt, von denen die drei ersten fortlaufend mit den Nummern der Serumproteinfraktionen enthaltenden Röhrchen aus dem Elphor Va Gerät gekennzeichnet werden (s. Abb. auf Seite 17). Der Streifen wird zweimal durch Pufferlösung gezogen, zwischen zwei Filterpapierbögen leicht, an der Auftragstelle etwas stärker abgetrocknet und auf den Elektrophoreserahmen gespannt. Mit einer Spezialpipette (Elphor 0,01 ml) werden auf die drei markierten Stellen jeweils aus den entsprechenden Gläsern 0,004 ml ihres Inhalts, auf die vierte 0,001 ml des dazugehörigen Serums aufgetragen. Anschliessend wird der Rahmen in die Elektrophoresekammer eingestellt, ein Glasdeckel aufgelegt und eine Gleichspannung von 110 V angelegt.

Die aufgetragenen proteinhaltigen Lösungen befinden sich auf der Kathodenseite; die Eiweisskörper wandern anodisch.

Nach 16 Stunden Laufzeit werden die Streifen herausgenommen, waagrecht auf einen Rahmen gespannt und im Trockenschrank bei 110° C 12 Minuten lang getrocknet.

Die Färbung der Eiweissfraktionen auf den Filterpapierstreifen.

Reagentien:

Amidoschwarzlösung bestehend aus:

Amidoschwarz	10 B (Bayer)	6,0 g
Eisessig		100,0 ml
Methanol		900,0 ml

Entfärbelösung aus:

Eisessig		100,0 ml
Methanol		900,0 ml

Verfahren: Die getrockneten Filterpapierstreifen mit den aufgetrennten Serumproteinfraktionen werden bei Zimmertemperatur 15 Minuten lang in die Amidoschwarzlösung gelegt und darin mehrmals leicht bewegt. Danach werden sie in 7 bis 8 aufeinanderfolgenden Entfärbungsbädern über insgesamt 4 bis 6 Stunden entfärbt. Dabei wird nur die nicht an Eiweiss gebundene Farbe herausgelöst. Die entfärbten Streifen werden mehrere Stunden lang luftgetrocknet.

C Die immunoelektrophoretische Untersuchung der vertikal aufgetrennten Serumproteinfraktionen

Mit geringen Änderungen wurde die Methode von S c h e i d - e g g e r (1955) verwendet.

Grundgedanke: In einem Agargel wird menschliches Serum elektrophoretisch aufgetrennt und dann der Einwirkung eines präzipitierenden Antikörpers ausgesetzt auf die Weise, dass man in einen Kanal in der Gelschicht Antihumanserum füllt und dieses gegen die Serumproteinfraktionen diffundieren lässt.

Reagentien:

Reinagar Op 22, Behringwerke Marburg
Antihumanserum vom Kaninchen, Behringwerke
Veronal-Natriumacetat-Puffer nach Michaelis

Geräte:

Eine selbstgebaute Elektrophoreseapparatur, in die jeweils sechs Präparate eingelegt werden konnten.
Objektträger (26 x 76 mm)

L e o n a - Werkschneidmesser Nr. 2

Verfahren: Für die Agarlösung wird 0,5 Reinagar mit 12,5 ml Aqua dest. und 12,5 ml Michaelispuffer erhitzt, sodass eine 2 %ige Agarlösung entsteht. Auf entfettete, vorgewärmte Objektträger werden mit einer vorgewärmten Säurepipette jeweils 2 ml des flüssigen Agars gegossen und gleichmässig verteilt. Nach Erstarren der Schicht wird in der Mitte mit

einem LEONA-Werkschnittmesser Nr. 2 ein ca. 6 cm langer Kanal ausgehoben, dann mittels einer Glasspritze mit abgeschliffener S III - Kanüle im Abstand von 5 mm auf beiden Seiten des Kanals ca. 7,5 mm von der Mitte der Objektträger entfernt je ein Loch ausgestanzt und der Agarpfropf aspiriert. Das eine Loch wird mit der zu untersuchenden Serumproteinfraktion, das andere mit dem dazugehörigen Serum gefüllt. Die Objektträger werden mit der dem Rand näheren Einfüllstelle nach der Kathodenseite in die Elektrophoresekammer eingelegt. Die Verbindung zwischen Anoden- und Kathodenkammer geschieht durch Filterpapierbrücken. Dann wird die Kammer mit einem an den Auflagestellen eingefetteten Glasdeckel verschlossen und eine Gleichspannung von 110 V angelegt.

Albumin, α_1 = und α_2 -Globulin wandern verschieden weit anodenwärts, β_1 = und β_2 -Globulin trennen sich etwa in Höhe der Einfüllstelle auf, während das gamma-Globulin kathodisch wandert.

Nach 1 1/2 Stunden werden die Präparate herausgenommen, sofort in eine feuchte Kammer gebracht und in den Mittelkanal Antihumanserum eingefüllt, bis er überall benetzt ist. Die Präparate werden in der feuchten Kammer bei 22° C aufbewahrt. Der Beginn der Albuminpräzipitation wird nach etwa 4 Stunden, der der anderen Fraktionen nach 18 - 20 Stunden gut sichtbar. Die Deutlichkeit nimmt im Verlauf von 48 - 72 Stunden noch zu.

Nach voller Ausbildung der Präzipitationsbanden — nach ca. 72 Stunden — wurden die Präparate photographiert.

DISKUSSION DER METHODIK

Bei der Durchführung der elektrophoretischen Untersuchungen des Serums ergaben sich einige Schwierigkeiten. Auf die dabei auftauchenden Probleme soll kurz eingegangen werden,

1. bei der Vertikalelektrophorese

Die Auftrennung des Serums im Elphor Va Gerät lässt sich wie oben beschrieben auf dem Trennbogen mit Bromphenolblau sichtbar machen. Die für unsere Zwecke optimale, d.h. möglichst breite Auffächerung des Eiweisspektrums ist abhängig von den

Vektoren des elektrischen Feldes und der Durchlaufgeschwindigkeit des Puffers (s.o. S.5).

Die Spektrumbreite lässt sich bis zu einem gewissen Grade durch Änderung eines der beiden Vektoren variieren. Mit stärkerer Füllung der Wanne wird auch mehr Puffer durch das Papier angesaugt, und der vertikale Ionentransport durch den stärkeren Pufferfluss beschleunigt. Daraus resultiert ein ~~schmäleres~~ Spektrum. Auch durch Änderung von Stromstärke und Spannung ist die Spektrumbreite zu beeinflussen. Jedoch soll die Leistung 12,0 Watt nicht überschreiten, da sonst die starke Erwärmung zum Trockenwerden des Papiers und zur Auskristallisation des Puffers führen kann.

2. bei der Immunoelektrophorese

J. J. Scheidegger gibt in seiner Methodik eine Laufzeit von 45 Minuten an. Bei unseren Versuchen stellte es sich heraus, dass der Abfall der angelegten Spannung sehr gross ist — am Rand des Objektträgers konnten nur noch 28 V gemessen werden — sodass nach 45 Minuten die Skala der aufgetrennten Fraktionen zu kurz und zu sehr aneinander gedrängt war und die einzelnen Banden nicht klar voneinander getrennt werden konnten. Das wurde auch deutlich durch Anfärben des Präparates mit Amidoschwarz nach der elektrophoretischen Auftrennung. Eine Laufzeit von 1 1/2 Stunden erwies sich uns am günstigsten.

Beim Ausstanzen des Mittelkanals nach der Scheidegger'schen Methode löste sich häufig die Agarschicht teilweise von der Unterlage, sodass das später eingefüllte Antihumanserum unter die Schicht floss, ungleichmässig eindiffundierte und sich dadurch schlechte Präzipitatbanden bildeten. Beim Ausschneiden des Kanals mit dem angegebenen Werkschnittmesser blieb die Agarschicht haften.

Es empfiehlt sich ferner, nach jeder elektrophoretischen Auftrennung die Pufferwannen des Apparates frisch zu füllen, da wegen des starken Stromflusses infolge geringen Widerstandes der kurzen Papierbrücken pH-Verschiebungen von pH 8,6 auf pH 9,6 auftreten. Andernfalls kommt es — offenbar infolge elektiv grösserer anodischer Wanderungsgeschwindigkeit des α_1 -Globulins — zur Überlagerung der Albuminbande mit den α_1 - Banden.

ER G E B N I S S E

Unsere Untersuchungen wurden mit 6 Seren von Personen durchgeführt, bei denen die Ergebnisse der Eiweisselektrophorese und der Serumlabilitätsproben normal waren, und die klinisch gesund erschienen. Auf pathologische Seren verzichteten wir, da es uns im Interesse der Genauigkeit der Untersuchungen auf die mehr oder weniger konstanten und besser bekannten Eiweissverhältnisse im Gesunden Serum ankam.

Nach vertikalelektrophoretischer Auftrennung des Serums in die einzelnen Proteinfractionen wurden die Reinheitskontrollen parallel mit Hilfe der horizontalen Papierelektrophorese und der Immunoelktrophorese durchgeführt.

Die Zugehörigkeit der einzelnen Präzipitationsbanden zu bestimmten Fraktionen wurde nach der Anzahl der Banden und im Vergleich mit den Präzipitaten des Gesamtserums angenommen. Zugrundegelegt wurden die Ergebnisse der Arbeit von S c h u l t z e und S c h w i c k (1957), die 1 Albumin, 3 α_1 -Globuline, 5 α_2 -Globuline, 4 β_1 -Globuline, 2 β_2 -Globuline und 1 γ -Globulin nachwiesen.

Es ergaben sich folgende Resultate: Nachfolgende Angaben sind als Beispiel gedacht und betreffen nur eine Untersuchungsreihe von Mehrfachbestimmungen der oben erwähnten sechs Seren. (Siehe Abbildung Seite 17 - 18).

Das Röhrchen Nr. 22, in dem man wegen seiner Stellung ganz am Anfang des Eiweisspektrums bei konstanten Strom- und Spannungs- Werten reines Albumin erwarten dürfte, enthält zwar nach dem Papierstreifen unvermisches Albumin, im Agar-Präparat zeigt sich jedoch schon eine α_1 -Bande.

Bei Glas 23 bemerkt man auf dem Streifen eine kaum sichtbare Farbverdichtung im α_1 -Bereich, die nicht sicher als Verunreinigung anzunehmen ist. Im Agarpräparat sind zwei α_1 -Banden deutlich sichtbar.

Bei Glas 24 - 28 zeigen beide Methoden eine Mischung von Albumin und α_1 -Globulin, bzw. Albumin, α_1 = und α_2 -Globulin.

In Nr. 29 scheint die Färbung bis zum β -Bereich auszulau-

fen, sodass auf eine Mischung von α_2 - und beta-Globulin geschlossen werden muss. Die Präzipitationen im Agargel zeigen α_1 - und α_2 -Mischung.

Bei Glas 30 sieht man eine α_1 -, α_2 - und beta-Globulinmischung.

Bei Glas 31 und 32 zeigt sich auf dem Papierstreifen reines beta-Globulin, während die Präzipitatbanden eine geringe Beimischung von α_2 -Globulin ergeben,

Für Nr. 33 ergibt sich bei beiden Kontrollen reines beta-Globulin,

bei Nr. 34 - 36 eine Vermischung mit gamma-Globulin.

Glas 37 und 38 enthalten reines gamma-Globulin, während Nr. 39 und 40 nach der Streifenmethode eiweissfrei sind, nach den Agarpräparaten jedoch noch geringe Mengen von gamma-Globulin aufweisen.

Glas 41 ist eiweissfrei und enthält nur noch Puffer.

Mit den anderen Seren erzielten wir übereinstimmende Ergebnisse. Bei der Untersuchung eines weiteren Serums konnten wir nach Anfärbung auf den Streifen sogar auf fünf reines Albumin enthaltende Gläser schliessen; bei der immunoelektrophoretischen Kontrolle fand sich in allen Fällen eine mehr oder weniger starke Verunreinigung mit α_1 -Globulin.

Es wird hierzu auf die Abbildungen auf Seite 17 - 18 verwiesen.

Die häufig von anderen Autoren beobachteten 1 oder 2 elektrophoretisch schneller als Albumin wandernden sogenannten Präalbumine konnten wir nicht nachweisen.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Das Verfahren der horizontalen papierelektrophoretischen Kontrolle war ursprünglich zur Bestimmung des Inhaltes der einzelnen Röhrchen aus dem Elphor Va Gerät gedacht. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass eine genaue Bestimmung des Reinheitsgrades damit nicht möglich ist. Die aus ihrem Zusammenhang gelösten Serumproteinfraktionen verhalten sich elektrophoretisch anders als die im Gesamtserum. Dazu kommt die Verdünnung der einzelnen Fraktionen mit Michaelispuffer (Elektrolyt !) im Verhältnis Fraktion zu Puffer wie ca. 1 : 4 gegenüber den Fraktionen im unverdünnten Gesamtserum. Die Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode wird offenbar etwas grösser. Da diese Wanderungsbeschleunigung aber auch je nach Konzentration der Fraktion in der Pufferlösung verschieden ist, lässt sich nichts Genaues über die Reinheit einer oder Vermischung zweier Fraktionen aussagen.

Ausserdem ist die Färbemethode nicht genügend empfindlich, um Verunreinigungen mit nur Spuren einer anderen Fraktion sichtbar zu machen. Das wird besonders deutlich bei einer Verunreinigung des Albumins mit geringen Mengen von α_1 -Globulin, denn häufig liessen sich bei der immunoelektrophoretischen Kontrolle neben dem Albuminpräzipitat eine oder mehrere Präzipitatbanden im α_1 -Bereich nachweisen, obwohl nach der Streifenkontrolle das Albumin rein erschien. Das muss natürlich bei Untersuchungen über die Glykoproteinverhältnisse nach vertikalelektrophoretischer Auftrennung des Serums zu falschen Ergebnissen führen, weil bekanntlich im Albumin wenig, im α_1 -Globulin dagegen sehr viel proteingebundener Zucker enthalten ist.

Die Kombination der elektrophoretischen und immunologischen Eiweissuntersuchungsmethode in der sogenannten Immunoelktrophorese ist besser zur Kontrolle geeignet, da sie eine weiter gehende Analyse eines Proteingemisches ermöglicht als das papierelektrophoretische Verfahren. Das beruht einerseits darauf, dass die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld im Agargel schneller und leichter vor sich geht als auf Pa-

pierstreifen, zum anderen auf der Auftrennung in die verschiedenen Fraktionsuntergruppen, die mit der bisher üblichen Methode nicht zu differenzieren waren. Die Genauigkeit der Ergebnisse wird dadurch gewährleistet, dass in einem Präparat das Serum und die dazugehörige zu untersuchende Fraktion gleichzeitig und in gleicher Masse den Auswirkungen des elektrischen Feldes ausgesetzt werden. Die Verdünnung der zu untersuchenden Fraktion mit elektrolytischem Puffer bewirkt nach unseren Erfahrungen keine so weitgehenden Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit, dass die einzelnen Präzipitatbanden nicht nach der Lokalisation im Vergleich zum Gesamtserum, ihrer Form und ihrer Beziehung zu Nachbarbanden eindeutig identifiziert werden könnten.

Ferner ist zu bemerken, dass das Antihumanserum nach Einfüllen in einen Mittelkanal in gleicher Weise nach beiden Seiten eindiffundieren und so gleichmässig auf die verschiedenen Eiweisskörper einwirken kann.

Die horizontalelektrophoretische Papierstreifenmethode nach Grassmann und Hannig dürfte für die meisten klinischen und wissenschaftlichen Untersuchungen eine ausreichende Genauigkeit besitzen. In dem ebenfalls von Grassmann und Hannig angegebenen vertikal-elektrophoretischen Verfahren zur Auftrennung und Gewinnung der einzelnen Serumproteinfraktionen selbst sind erhebliche Fehlerquellen verborgen. Will man also mit dieser Methode arbeiten mit dem Ziel, reine Fraktionen zu gewinnen, muss man deren Reinheit mit einer genügend empfindlichen Testmethode prüfen.

Hierfür scheint uns das in der vorliegenden Arbeit beschriebene immunoelktrophoretische Kontrollverfahren geeignet zu sein, weil es, wie im Einzelnen dargelegt, eine genügende Empfindlichkeit und Genauigkeit besitzt.

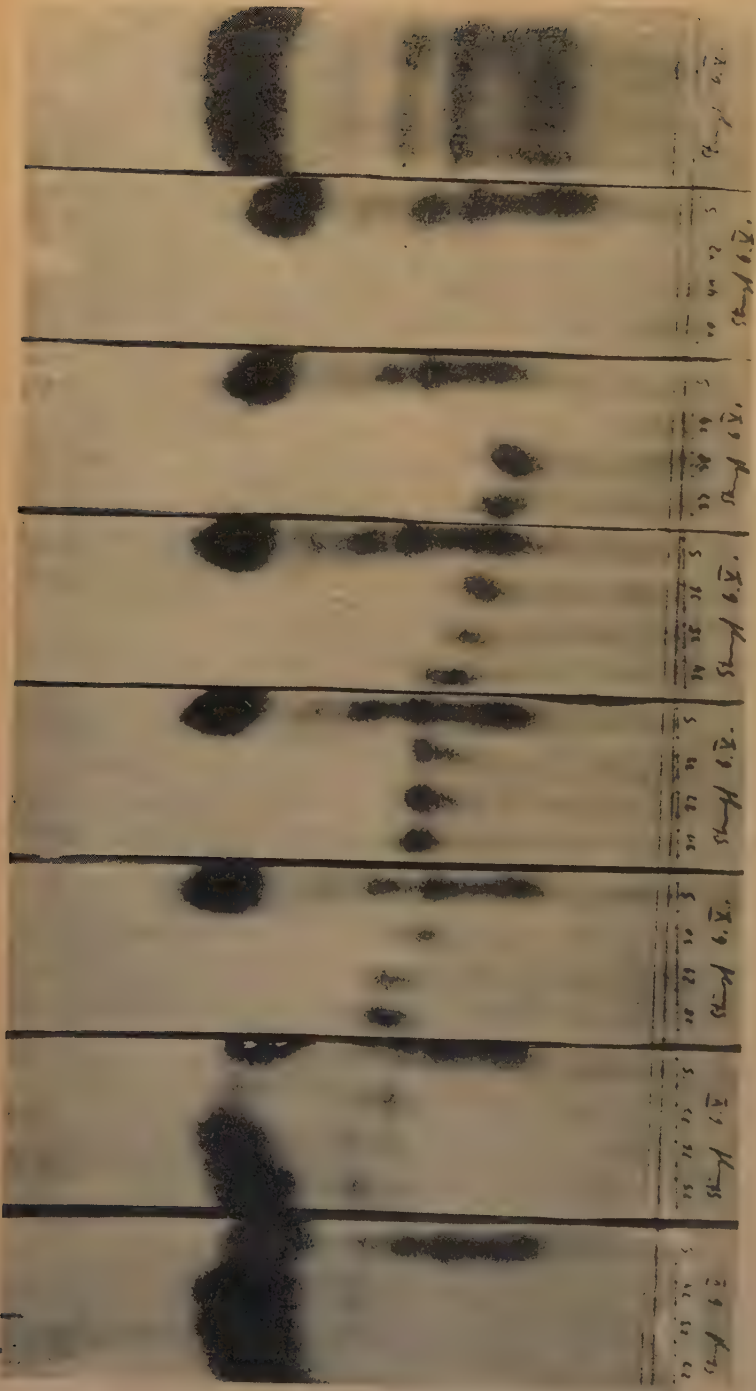
ZUSAMMENFASSUNG

Es wird zunächst auf den Anlass zu der vorliegenden Arbeit, die Schwierigkeit der Reingewinnung von einzelnen Proteinfractionen aus menschlichem Serum mit Hilfe der vertikalelektrophoretischen Methode, eingegangen. Die anfangs durchgeführte Bestimmung der in den einzelnen Röhrchen des Elphor Va Gerätes anfallenden Serum-eiweissfractionen erwies sich als zu ungenau. In der Folge wurde die Reinheitskontrolle dieser vertikalelektrophoretisch gewonnenen Eiweissfractionen mit der Methode der Immunelektrophorese vorgenommen.

Die einzelnen Verfahren, das der vertikalelektrophoretischen Auftrennung von Serumproteinen, und die beiden Kontrollverfahren mit Hilfe der horizontalen Papierelektrophorese und der Immunelektrophorese in Agar-gel werden im Einzelnen beschrieben.

Es folgt ein Vergleich der Empfindlichkeit und Genauigkeit beider Kontrollmethoden an Hand der vertikalelektrophoretisch gewonnenen Eiweissfractionen eines menschlichen Normalserums. Auf ähnliche Befunde an fünf weiteren Seren wird hingewiesen.

Es wird ferner dargelegt, inwiefern die Immunelektrophoretische Reinheitskontrolle von Eiweissfractionen, die in vitro vorliegen, eine hohe Genauigkeit aufweist.



22 23 24 S 25 26 27 S 28 29 30 S 31 32 33 S 34 35 36 S 37 38 39 S 40 41 42 S Serum

Papierelektrophoretische Kontrolle Erklärung s. Text



Immunelektrophoretische
 Kontrolle
 Erklärung s. Text

L I T E R A T U R

- Bockemüller, W., Oetter, A. Arb. Paul Ehrlich Inst. 52, 1956
- Burtin, P. Bull. Soc. Chim. Biol. 37, (9-10), 1955
- Cleve, H., Hartmann, F.,
Ritter, R. Dtsch. Arch. Klin. Med. 204, 1957
- Crowle, A. J. J. Laborat. Klin. Med. 48, 4, 1956
- Curtis, A., Williams, C. A. J. Immunol. 74, 158, 1955
- Grabar, P. Bull. Soc. Biol. Chim. 37, 783, 1955
- Faure, R., Fine, J. M.,
Saint Paul, M., Eyquen, A.,
Grabar, P. Zschr. Immunforsch. 114, I, 1957
- Götz, H., Berg, G.,
Scheiffarth, F. Biochem. Biophys. Acta 10, 193, 1953
- Grabar, P., Williams, C. A. Jr. Biochem. Biophys. Acta 17, 67, 1955
- Grabar, P., Williams, C. A. Bull. Soc. Chim. Biol. 36, 65, 1954
- Grassmann, W., Hannig, K. Naturwiss. 37, 496, 1950
- Grassmann, W., Hannig, K. Z. phys. Chem. 290, 1, 1952
- Grassmann, W., Hannig, K. Hoppe Seyler Zschr. 292, 32, 1953
- Hotchkiss, R. D. Arch. Biochem. 16, 131, 1948
- Köiw, E., Grönwall, A. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 4, 244, 1952
- Lang, N. Strahlenther. München Sonderbd. 36, 1956
- Rondle, C. J. Experientia Basel 112, II, 1956
- Scheidegger, J. J. Int. Arch. Allergy 7, 103, 1955
- Scheidegger, J. J. Sem. Hop. Paris 32, 37, 1956

- | | |
|------------------------------|--|
| Schultze, H.E., Schwick, G. | Behringwerk-Mitt. 33, 1957 |
| Schwick, G. | Laboratoriumsblätter 8, 1, 1956 |
| Simon, K. | Zschr. Ges. Inn. Med. 12, 3, 1957 |
| Stumpf, W. | Inaugural-Diss. 1956 München |
| Uriel, J., Scheidegger, J.J. | Bull. Soc. Chim. Biol. 37, 165, 1955 |
| Uriel, J., Grabar, P. | Ann. Inst. Pasteur 90, 427, 1956 |
| Wieme, R.J. | Bull. Soc. Chim. Biol. 37, (9-10) 1955 |

Herrn Prof. Dr. Walter Seitz bin ich für die Überlassung des Themas zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Walter Stumpf danke ich für tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Versuche und für seine stete Bereitschaft zu verständnisvollem Rat.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Weber für Geduld und Mühe, die er beim Photographieren der Präparate aufgewendet hat.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 30. April 1933 als Tochter des Prakt. Arztes Dr. med. Arthur Bräuer und seiner Ehefrau Hilde, geb. Bär, in Birkenfeld an der Nahe geboren. Dort besuchte ich von 1939 bis 1942 die Volksschule und von 1942 bis 1951 das Staatliche Neusprachliche Gymnasium. Nach bestandener Reifeprüfung immatrikulierte ich mich zum Wintersemester an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz und legte dort 1954 die ärztliche Vorprüfung ab.

Die klinischen Semester studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich am 9. Dezember 1957 die ärztliche Prüfung bestand.

Vom 1.1.1958 bis zum 31.5.1958 war ich an der Medizinischen Poliklinik der Universität München als Medizinalassistentin tätig, anschliessend bis zum 31.8.1958 an der 2. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses am Biederstein zu München.

Seit dem 1.10.1958 arbeite ich als Medizinalassistentin in der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses rechts der Isar in München.

